Código do Produto: 0608

# *Mycobacterium tuberculosis* Qual qPCR Box 1.0

Dispositivo para utilização *in vitro*

## Manual de Instruções

DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS
geneBOX

Versão1.1; Maio de 2010.

## Apresentação

*Mycobacterium tuberculosis*, bacilo da tubeculose, agente patogénico transmitido via respiratória, por saliva de individuos contaminados proveniente da tosse, espirro ou fala.

***Mycobacterium tuberculosis*** **Qual qPCR Box 1.0** é um teste para diagnóstico molecular da infecção, com maior sensibilidade, especificidade e rapidez do que o tradicional teste de tuberculina ou cultura do microorganismo.

***Mycobacterium tuberculosis*** **Qual qPCR Box 1.0** detecta a região senX3-regX3 do genoma de *Mycobacterium tuberculosis*.

## Alterações e melhoramento do Produto

Este produto pode ser melhorado de modo a aumentar o seu rendimento. As alterações, adições ou modificações de MYCT Mix, Controlo interno, Controlo positivo ou controlo negativo, em relação ao lote anterior estão detalhadas na tabela abaixo:

| Tubo | Modificação | Motivo |
|---|---|---|
| N/A | | |

## Controlo de Qualidade

O kit Mycobacterium tuberculosis Qual qPCR Box 1.0 foi testado com DNAs extraídos de culturas celulares das linhas ATCC 25177 de Mycobacterium tuberculosis Qual qPCR Box 1.0 e outras espécies de bactérias obtendo amostras positivas e negativas. A Genebox garante a qualidade e a fiabilidade do seu kit Mycobacterium tuberculosis Qual qPCR Box 1.0.

## Especificidade

O kit Mycobacterium tuberculosis Qual qPCR Box 1.0 é específico para a detecção da região senX3-regX3 do DNA genómico de amostras biológicas.

A sua especificidade foi comprovada com DNAs extraídos de culturas celulares de ATCC 25177 de *Mycobacterium tuberculosis* e outras espécies de bactérias obtendo amostras positivas e negativas.

A especificidade do kit Mycobacterium tuberculosis Qual qPCR Box 1.0 é conferida por MYCT mix, que apresenta 100% de homologia com todas as sequências de *Mycobacterium tuberculosis* registadas em bases de dados.

## Sensibilidade

A sensibilidade do kit Mycobacterium tuberculosis Qual qPCR Box 1.0 foi testada e a Genebox garante a detecção de níveis mínimos da região senX3-regX3 do genoma de *Mycobacterium tuberculosis* até 10 ng de DNA

## Componentes do Mycobacterium tuberculosis Qual qPCR Box 1.0 Kit

- **Mistura de reacção MYCT**

  1 tubo **MYCT mix** – 2 ml (conservar de -15 a -30ºC)

- **Controlo Interno CI**

  1 tubo **CI** – 500 µL (conservar de -15 a -30 ºC)

- **Controlo Positivo CP**

  1 tubo **CP** - 25 µl (conservar de -15 a -30 ºC)

- **Controlo negativo CN**

  1 tubo **CN** - 25 µl (conservar de -15 a -30ºC)

- **Manual de instruções**

  1 Manual de Instruções

**Componentes da qPCR Master Mix**

**Primers e sonda:**
Concentração final de cada 1,2; 0,9 e 0,2 mM

**Nucleótidos:**
Concentração final de cada dNTP é 0.5 mM

**Tampão da PCR:**
concentrações finais são 4 mM $MgCl_2$ e 0.4 u/µl
hot-start Taq DNA polimerase, pH 8.3.

**Rox:**
concentração final é de 15 nM

# Protocolo de amplificação por PCR

## *Reagentes*

- Amostra de DNA (100-200 ng/µl)
- Mistura de reacção **MYCT mix**
- Controlo interno **CI**
- Controlo positivo **CP***
- Controlo negativo **CN**
- Água bi-destilada estéril (não fornecida)

* Este componente apresenta alto potencial contaminante, dado conter DNA de *Mycobacterium tuberculosis*, recomenda-se o máximo cuidado no seu manuseamento.

## *Extracção de DNA*

Para a detecção de Mycobacterium tuberculosis por PCR em tempo real é necessário DNA extra puro. Recomenda-se que o isolamento de DNA seja efectuado utilizando kits de extracção com marcação CE, que garantam um rácio DO 260/280 maior do que 1.6 e uma concentração entre 100ng – 200 ng/µl.

## *Amplificação por PCR*

1. Agite brevemente todos os tubos do kit e os tubos de DNA
2. Para cada detecção pipete de acordo com a tabela I:

| Componente | 1 Reacção |
|---|---|
| **Tubo MYCT** mix | 20 µl |
| **Tubo** Controlo Interno **CI** | 2,5 µl |
| DNA de amostra | 2,5µl |
| **Volume final** | 25 µl |

3. Para o controlo positivo proceder como em (2), substituindo o DNA de amostra por 2,5 µl de **Tubo** Controlo Positivo **CP**.
4. Para o controlo negativo proceder como em (2), substituindo o Controlo Interno por 2,5 µl de água bidestilada estéril e o DNA de amostra por 2,5 µl de **Tubo** controlo negativo **CN.**

**NOTA:** Cada detecção deve ser realizada com pelo menos duas reacções em duplicado. Por cada utilização do kit deve correr, pelo menos, uma reacção CP**.**

## *Programa PCR*

| Passo | Temperatura | Tempo | Ciclos |
|---|---|---|---|
| Desnaturação | 95 ºC | 10 min | 1 |
| Desnaturação<br>Emparelhamento<br>Extensão* | 95 ºC<br>58 ºC<br>72 ºC | 10 seg<br>30 seg<br>40 seg* | 40 |
| Fim | 4 ºC | Infinito | 1 |

***** A detecção de fluorescência nos canais FAM e JOE deve ser coleccionada , no final de cada extensão.

Análise de resultados.

## Tabela de Interpretação de resultados

**Tabela I**- Interpretação de análises válidas

| ***Poço*** | ***Mycobacterium tuberculosis*** **(**Fluorescência **FAM)** | **Controlo Interno (**Fluorescência **JOE)** | **Interpretação** | **Validação** |
|---|---|---|---|---|
| Amostra | + | + | *M. tuberculosis* Positivo | Validado |
| Amostra | - | + | *M. tuberculosis* Negativo | Validado |
| **CP** | + | + | Controlo positive | Validado |
| **CN** | **-** | - | Controlo Negativo | Validado |

**Tabela II**- Interpretação de análises não válidas

| ***Poço*** | ***Mycobacterium tuberculosis*** **(**Fluorescência **FAM)** | **Controlo Interno (**Fluorescência **JOE)** | **Interpretação** | **Validação** |
|---|---|---|---|---|
| Amostra | + | - | *M. tuberculosis* Positivo (?) | Repetir reacção |
| Amostra | **-** | - | *M. tuberculosis* negativo (?) | Repetir reacção |
| **CP** | **+** | - | Controlo positivo inválido | Repetir reacção |
| **CP** | **-** | - | Controlo positivo inválido | Repetir reacção |
| **CP** | **-** | + | Controlo positivo inválido | Repetir reacção |
| **CN** | **-** | + | Controlo negativo inválido | Repetir reacção |
| **CN** | **+** | + | Controlo negativo inválido | Repetir reacção |
| **CN** | **+** | - | Controlo negativo inválido | Repetir reacção |

# Guia de resolução de problemas

## PROBLEMAS

1. Valores de Ct para a amostra muito elevados.
2. Os controlos internos falharam em diversos poços.
3. Falsos negativos e Controlo Interno normal.
4. Falsos positivos e Controlo Interno normal.
5. Resultados ambíguos
6. Ruído de fluorescência
7. Ausência total de fluorescência

## Possíveis Causas

a) Concentração do DNA baixa.
b) Degradação do DNA.
c) Presença de inibidores da Taq polimerase nas amostras de DNA.
d) Excesso de DNA.
e) Contaminação com outros produtos de PCR ou outras amostras de DNA durante a preparação das reacções de PCR.
f) Equipamento descalibrado.
g) Contaminação dos reagentes do kit.

## SUGESTÕES

1. Verifique a qualidade e concentração do DNA.
2. Re-purifique o DNA e dilua-o em água desionisada/destilada.
3. Ajuste a concentração do DNA para a desejada.
4. Repita a detecção/reacção com o DNA com maior qualidade.
5. Separe a zona de extracção de DNA da zona de preparação das reacções.
6. Vista uma bata diferente para cada sala.
7. Esterilize bem a zona de trabalho.
8. Mude várias vezes de luvas, especialmente na transição da zona de manuseamento de amostras clínicas para a zona de preparação da reacção.
9. Verifique a compatibilidade das placas de PCR em tempo real e respectivos selantes, com o equipamento de PCR em tempo real utilizado.
10. Verifique a correcta utilização do equipamento de PCR em tempo real e respectivo software de análise.
11. Verifique a calibração do equipamento: parâmetros térmicos e de fluorescência; e calibração de pipetas.

# Guia Técnico

## 1. Pureza e Concentração do DNA

Para obter bons resultados com o Mycobacterium tuberculosis Qual qPCR Box 1.0 a pureza da amostra de DNA é crítica. Ter uma amostra pura significa obter uma razão 260nm/280nm de DO superior a 1.6 e uma porção de DNA superior a 9.4 kb. A elevada degradação do DNA ou uma razão 260nm/280nm inferior a 1.5 requer uma nova extracção de DNA.
Cada amostra de DNA deve ter aproximadamente 100 a 200 ng/µl. Concentrações elevadas de DNA provocam um declínio considerável na especificidade da PCR.
Recomenda-se o uso de qualquer kit de extracção de DNA que apresente marcação CE, de modo a obter um DNA extra puro.

## 2. DNA Polimerase

O Mycobacterium tuberculosis Qual qPCR Box 1.0 foi intensivamente testado utilizando a DNA polimerase da Reagente 5 (Reagente 5, Lisboa, Portugal).

## 3. MYCT mix

Para uma boa performance detecção de *Mycobacterium tuberculosis* com o Mycobacterium tuberculosis Qual qPCR Box 1.0 é obrigatória a utilização da MYCT Mix fornecida com o Kit.

## 4. Procedimentos de amplificação

Para uma correcta utilização do kit aconselha-se a seguir o programa de PCR apresentado neste Manual de Instruções.

## 5. Termociclador

Este kit foi optimizado em Applied Biosystems ® 7500. Recomenda-se utilização de um equipamento de qPCR que apresente as seguintes características: Excitação e emissão pelo menos até 494 nm e 521 nm; - “heating rate” mínima de 1.6°C/seg; “cooling rate” mínima de 1.6ºC/seg; gama de temperaturas 4-100ºC; uniformidade de temperaturas ±0.5ºC; “heated lid” superior a 100ºC; calibrado para fluorescências ROX™, FAM e JOE, e Software de análise de resultados.

## 6. Validade

Como especificado na embalagem

**Se os problemas persistirem, por favor contactem com o apoio técnico para o**
**+351 231 410 946**

# Garantia

geneBOX – investigação e desenvolvimento de teste diagnósticos garante que os primers presentes no kit Mycobacterium tuberculosis Qual qPCR Box apresentam as especificidades dadas tabelas de interpretação de resultados do produto.

## 1. MYCT mix, CI, CP e CN

Armazenamento a -20ºC, MYCT mix, CI, CP e CN permanecem estáveis durante 12 meses a partir da data de produção (ver validade do lote na embalagem).
Armazenamento a 4ºC, de MYCT mix, CI, CP e CN permanecem estáveis durante 15 dias a partir da data de recepção.
À temperatura ambiente, MYCT mix, CI, CP e CN permanecem estáveis durante 3 dias a partir da data de recepção.
MYCT mix, CI, CP e CN nunca devem ser deixados ou armazenados com a tampa aberta.

## 2. DNA

O DNA extraído por *salting out* ou por qualquer outro método deve ser armazenado a 4ºC ou -20ºC. Ao optar pela congelação das amostras, devem ser evitadas ciclos repetidos de congelação/descongelação, de modo a impedir a degradação da amostra.
As amostras de DNA armazenadas em $dH_2O$ permanecem estáveis durante, pelo menos, 4 semanas (a 4ºC) ou 2 anos (a -20ºC).
As amostras de DNA armazenadas em tampão TE permanecem estáveis durante, pelo menos, 2 anos (a 4ºC) ou 5 anos (a -20ºC).

# Aviso de garantia

geneBOX –investigação e desenvolvimento de teste diagnósticos responsabiliza-se, perante os seus clientes, pelos defeitos no material e componentes dos seus produtos aplicados em condições normais. Os produtos da empresa que apresentam esta garantia devem ser substituídos, sem encargos para o cliente.

Esta garantia aplica-se só para produtos que sejam manipulados e armazenados de acordo com as especificações e recomendações de utilização.

As reclamações devem ser enviadas, por escrito, directamente para a geneBOX e devem ser acompanhadas por uma cópia da guia de transporte ou factura do produto.

Este produto não pode ser reformulado, reembalado ou revendido em nenhuma forma sem o expresso consentimento da geneBOX - investigação e desenvolvimento de teste diagnósticos.

# Declaração de Conformidade

**Nome do Produto:** Mycobacterium tuberculosis Qual qPCR Box 1.0

**Numero do Produto:** GB.06.08

**Utilização:** Detecção de *Mycobacterium tuberculosis.*

**Produção:** geneBOX - R&D Diagnostic Tests,
biocant – centro de inovação em biotecnologia
núcleo 4, lote 3
3060-197 cantanhede, portugal

Nós, geneBOX - investigação e desenvolvimento de testes de diagnóstico, indubitavelmente declaramos que este produto, ao qual se relaciona esta declaração de conformidade, está em conformidade com os seguintes documentos normativos, ISO 9001:2008 e ISO 13485:2004. Seguindo ainda, as indicações da Directiva Europeia 98/79/CE sobre dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*, conformidade de acordo com o Anexo IV, transposto para as leis nacionais dos estados membros da União Europeia.
Europeia.

A ficha e os documentos técnicos deste produto são mantidos na geneBOX, biocant, centro de inovação em biotecnologia, 3060-197 Cantanhede, Portugal.

Cantanhede, Portugal
Maio 2010

Sandra Balseiro
Directora Técnica

# Folha de Dados de Segurança (1/3)
Material Safety Data Sheet (MSDS)

## geneBOX - R&D Diagnostic Tests™ qPCR Kits

## Produtos qPCR da geneBOX ™

Esta folha de dados de segurança é aplicável a todos os produtos de qPCR da geneBOX™.

### 1. Produtos Químicos e Identificação da Companhia

Data de realização: Maio 2010
Grupo do produto: Produtos de PCR em tempo real da geneBOX™
Manufacturação: geneBOX - R&D Diagnostic Tests,
biocant, centro de inovação em biotecnologia
núcleo 4, lote 3
3060-197 Cantanhede, Portugal
tel: + 351 231410946
fax: +351 231 410947
e-mail: info@genebox.com

### 2. Composição e Informação sobre os reagentes

| Componente | Químico | Nome vulgar | Nº de lote |
|---|---|---|---|
| Mistura de primers | Acido Desoxiribonucleico | Oligonucleótido | |
| Mistura de reacção | Desoxiribonucleótidos | Nucleótidos | |
| | Tampão | | |
| | Cloreto de Magnésio | MgCl2 | |
| | Carboxi-x-rodamina Rox | | |
| | DNA polimerase | | |
| Controlo interno | Acido Desoxiribonucleico | Oligonucleótido | |
| Controlo positivo | Acido Desoxiribonucleico | DNA | |
| Controlo negativo | $H_2O$ | Água bidestilada estéril | |

### 3. Propriedades físico-químicas:

| Componente | Aspecto | Cor | Odor |
|---|---|---|---|
| Mistura de primers | líquido | incolor | nenhum |
| Mistura de reacção | líquido | incolor | nenhum |
| Controlo Interno | líquido | incolor | nenhum |
| Controlo Positivo | líquido | incolor | nenhum |
| Controlo Negativo | líquido | incolor | nenhum |

# Folha de Dados de Segurança (2 / 3)
Material Safety Data Sheet (MSDS)

## 4. Informação Toxicológica

**Químico** **Toxicidade**

ROX Contacto cutâneo: Provoca irritação cutânea.
Absorção cutânea: Pode ser nocivo se absorvido através da pele.
Contacto ocular: Provoca irritação nos olhos.
Inalação: Pode ser nocivo se inalado. O material é irritante para o trato respiratório superior.
Ingestão: Pode ser nocivo se deglutido.

## 5. Estabilidade e reactividade

**Condições a evitar**: Calor e humidade.
**Incompatibilidades:** Bases e agentes oxidantes fortes.

## 6. Protecção pessoal.

**Protecção das mãos:** use luvas apropriadas, resistentes a químicos.
**Protecção dos olhos:** recomenda-se o uso de óculos de protecção química.

## 7. Manipulação e armazenamento

**Manipulação:** evite o contacto directo com a substância.
**Armazenamento:** armazene à temperatura aconselhada, proteja do contacto com a luz.
**Danificação da embalagem protectora:** rejeitar o constituinte contido na embalagem.

## 8. Perigos

**Os componentes da mistura de reacção** podem ser perigosos se inalados, ingeridos ou absorvidos pela pele. Este material pode causar irritação da pele, dos olhos e do tracto respiratório. A ingestão de grandes quantidades desta mistura pode causar dores de estômago, vómitos ou diarreia.

## 9. Medidas de Primeiros Socorros

No caso de **contacto com os olhos**, deve lavar imediatamente os olhos com água abundante por cerca de 15 minutos. Deve consultar o seu médico.
No caso de **contacto com a pele**, deve lavar imediatamente a zona afectada com água corrente e sabão. Lave a roupa contaminada antes da sua utilização.
No caso de **ingestão**, lave a boca com água abundante. Deve contactar o seu médico se necessário.
No caso **de inalação**, mudar a vítima para um local arejado. Se encontrar inanimado aplique respiração artificial. Se apresentar dificuldades respiratórias aplique oxigénio. Deve consultar o seu médico.

## 10. Medidas a tomar em caso de incêndio

**Meios de extinção**: Água, dióxido de carbono, pó químico seco ou espuma apropriada.
**Meios de extinção não aconselhados:** não existem restrições conhecidas.
**Perigos específicos de exposição:** em caso de incêndio podem emitir fumos tóxicos de dióxido e monóxido de carbono, nitrogénio, fósforo, cloreto de hidrogénio, e gás hidrogénio.
**Equipamento especial de combate ao incêndio:** quando são libertadas grandes quantidades de substância trabalhe apenas com protecção adequada para olhos e pele.

# Folha de Dados de Segurança (3/3)
Material Safety Data Sheet (MSDS)

## 11. Medidas a tomar no caso de derrame acidental
**Precauções pessoais:** evite o contacto directo com a substância.
**Limpeza:** limpe normalmente a área afectada, não são necessários cuidados adicionais.
**Protecção da pele:** use uma bata de laboratório.

## 12. Informação ecológica
Não existem dados disponíveis.

## 13. Informação sobre a eliminação
Elimine o material de acordo com toda a regulamentação aplicável (Grupo IV – resíduos hospitalares específicos).

## 14. Informação sobre o 6
No transporte dos Kits devem estar a seguradas as temperaturas, não devendo ultrapassar os 16ºC. A duração do transporte não deve ser superior a 3 dias, de modo a garantir que todos os componentes do Kit cheguem em perfeitas condições aos seus destinatários.

## 15. Contactos Úteis
Número Nacional de Emergência: 112
Centro de Informação Anti-Venenos: 808 250 143

## 16. Outras informações
As informações a cima disponíveis são baseados no nível de conhecimento actual, devendo ser utilizado apenas como guia. A geneBOX - R&D Diagnostic Tests não se responsabiliza por qualquer dano causado pela manipulação inapropriada ou pelo contacto com os referidos produtos.

**Para mais esclarecimentos, por favor contactem com o apoio técnico para o**
**+351 231 410 946**

# Referências

1. Espy M, Uhl J, Sloan L, Buckwalter S, Jones M, Vetter E, Yao J, Wengenack N, Rosenblatt J, Cockerill F, Smith F. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing Clin Microbiol Rev 2006; 19(1):165-256

2. Broccolo F, Scarpellini P, Locatelli G, Zingale A, Brambilla A, Cichero P, Sechi LA, Lazzarin A, Lusso P, Malnati MS. Rapid Diagnosis of Mycobacterial Infections and Quantitation of *Mycobacterium tuberculosis* Load by Two Real-Time Calibrated PCR Assays.Journal of Clinical Microbiology 2003; 41(10):4565-4572

CE

DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS
geneBOX

geneBOX - R&D Diagnostic Tests,
biocant, centro de inovação em biotecnologia
núcleo 4, lote 3
3060-197 Cantanhede, Portugal
tel:+ 351 231 410 946
fax:+351 231 410 947
e-mail:info@genebox.com